

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年    9 月    9 日  
Date of Application:

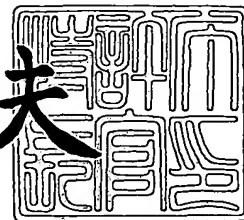
出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 3 1 7 1 1 0  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 3 - 3 1 7 1 1 0 ]

出      願      人                      富士写真フイルム株式会社  
Applicant(s):

2 0 0 3 年 1 2 月 2 2 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 A31501A  
【提出日】 平成15年 9月 9日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12P 7/64  
【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内  
    【氏名】 小島 政芳  
【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内  
    【氏名】 駒澤 宏幸  
【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内  
    【氏名】 川上 雅之  
【発明者】  
    【住所又は居所】 広島県東広島市西条町助実 2 4 番地 4 号  
    【氏名】 秋 庸裕  
【発明者】  
    【住所又は居所】 広島県東広島市高屋高美が丘 4 - 1 - 9  
    【氏名】 小埜 和久  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000005201  
    【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 110000109  
    【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス  
    【代表者】 今村 正純  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2002-378907  
    【出願日】 平成14年12月27日  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 170347  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0205141

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

ドコサヘキサエン酸生産能を有するスラウストキトリウム (*Thraustochytrium*) 属菌株。

**【請求項 2】**

スラウストキトリウム (*Thraustochytrium*) 属 L F F 1 株 (受託番号 F E R M P - 1 9 1 5 9)、該 L F F 1 株と同一の種に属する菌株、または該 L F F 1 株と実質的に同一の菌学的性質を有する菌株。

**【請求項 3】**

ドコサヘキサエン酸生産能を有するスラウストキトリウム (*Thraustochytrium*) 属菌株を培地中で培養し、培養物からドコサヘキサエン酸含有油脂を採取することを含む、ドコサヘキサエン酸含有油脂の製造方法。

**【請求項 4】**

ドコサヘキサエン酸生産能を有するスラウストキトリウム (*Thraustochytrium*) 属菌株が、スラウストキトリウム (*Thraustochytrium*) 属 L F F 1 株 (受託番号 F E R M P - 1 9 1 5 9)、該 L F F 1 株と同一の種に属する菌株、または該 L F F 1 株と実質的に同一の菌学的性質を有する菌株である、請求項 3 に記載のドコサヘキサエン酸含有油脂の製造方法。

**【請求項 5】**

油脂中に全脂肪酸あたり、ドコサペンタエン酸を 10 重量%以下、及びドコサヘキサエン酸を 30 重量%以上の量で含有する、ドコサヘキサエン酸含有油脂。

**【請求項 6】**

油脂中に全脂肪酸あたりドコサヘキサエン酸を 50 重量%以上の量で含有する、請求項 5 に記載の油脂。

**【請求項 7】**

ドコサヘキサエン酸生産能を有するスラウストキトリウム (*Thraustochytrium*) 属菌株を培地中で培養し、培養物からドコサヘキサエン酸含有油脂を採取することによって得られる油脂である、請求項 5 又は 6 に記載の油脂。

**【請求項 8】**

スラウストキトリウム (*Thraustochytrium*) 属 L F F 1 株 (受託番号 F E R M P - 1 9 1 5 9)、該 L F F 1 株と同一の種に属する菌株、または該 L F F 1 株と実質的に同一の菌学的性質を有する菌株を培地中で培養し、培養物からドコサヘキサエン酸含有油脂を採取することによって得られる油脂である、請求項 5 から 7 の何れかに記載の油脂。

**【請求項 9】**

菌株の培養物から採取することによって得られる油脂を精製することによって得られる油脂である、請求項 5 から 8 の何れかに記載の油脂。

**【請求項 10】**

油脂が、菌体培養によって油脂を製造する途中の培養液若しくはその殺菌した培養液、又は培養終了時の培養液若しくはその殺菌した培養液、又はそれぞれから集菌した培養菌体若しくはその乾燥物、またはその培養液若しくはその菌体から該油脂を採取した後の残渣に含まれるものである、請求項 5 から 9 の何れかに記載の油脂。

**【請求項 11】**

請求項 3 又は 4 に記載の製造方法により得られるドコサヘキサエン酸含有油脂又は請求項 5 から 10 の何れかに記載のドコサヘキサエン酸含有油脂から、ドコサヘキサエン酸を単離することを含む、ドコサヘキサエン酸の製造方法。

**【請求項 12】**

ドコサヘキサエン酸含有油脂をリパーゼで処理した後に、ドコサヘキサエン酸を単離する、請求項 11 に記載のドコサヘキサエン酸の製造方法。

**【請求項 13】**

請求項 3 又は 4 に記載の製造方法により得られるドコサヘキサエン酸含有油脂、請求項 5 から 10 の何れかに記載のドコサヘキサエン酸含有油脂、又は請求項 11 又は 12 に記載

の方法により得られるドコサヘキサエン酸に水素添加を行なうことを含む、ベヘン酸の製造方法。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のベヘン酸を含むベヘン酸銀を用いる、写真感光材料の製造方法。

## 【書類名】 明細書

【発明の名称】 ドコサヘキサエン酸生産能を有する微生物及びその利用

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ドコサヘキサエン酸（DHA）生産能を有する新規微生物、並びに該微生物の利用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ドコサヘキサエン酸は、動物の脳や網膜に特異的に存在する高度不飽和脂肪酸であり、それらの器官における重要な生理的役割を果たすとともに、抗炎症作用、血中コレステロール低下作用などの生理活性をも有する。そのようなことから、ドコサヘキサエン酸は、医薬、食品分野における利用が注目されている有用物質であり、近年、健康食品や乳児用ミルクなど、機能性食品分野においても利用が広がっている。

## 【0003】

ドコサヘキサエン酸は、青魚に属する魚油中に含まれ、特にイワシやマグロ由来の油には20%前後含まれている。魚由来のドコサヘキサエン酸含有油脂を食品分野において利用する場合の大きな問題は、魚臭を取り除くために多大な操作を必要とすることである。また、魚由来のドコサヘキサエン酸含有油脂には、アラキドン酸やイコサペンタエン酸（EPA）など各種の高度不飽和脂肪酸が含まれるため、酸化され易く、安定した品質の油脂を得ることが困難である。さらに、ドコサヘキサエン酸を医薬品等の分野で利用する場合には、ドコサヘキサエン酸含有油脂からドコサヘキサエン酸を分離精製することが必要であるが、ドコサヘキサエン酸に構造が類似した各種高度不飽和脂肪酸が含まれているため、分離精製は困難である。特に乳児用ミルクの調合においては、イコサペンタエン酸含有割合の低いドコサヘキサエン酸含有油脂が望ましいが、供給源が魚油の場合、イコサペンタエン酸のみを効率的に除くことはきわめて困難である。

## 【0004】

魚油以外のドコサヘキサエン酸の供給源として、微生物による生産方法が考えられている。ドコサヘキサエン酸含有油脂を生産する微生物としては、深海から分離された細菌ビブリオ マリナス (*Vibrio marinus*) や深海魚の腸内から分離されたビブリオ属細菌、鞭毛菌類であるスラウストキトリウム アウレウム (*Thraustochytrium aureum*)、ジャポノキトリウム (*Japonochytrium* sp.)、微細藻類であるシクロテラ クリプティカ (*Cyclotella cryptica*) などが知られており、これらの微生物を利用した培養法によるドコサヘキサエン酸含有油脂の生産も検討されてきた(特許文献1)。しかしながら、従来公知の微生物による方法によれば、培地1リットル当たりのドコサヘキサエン酸含有油脂の生産量が100~700mg程度と少なく、ドコサヘキサエン酸の生産量としても非常に低かった。

## 【0005】

また、特許文献2および特許文献3には、シゾキトリウム属菌株 (SR21) を用いてドコサヘキサエン酸を生産することが記載されているが、生産量が少ない、培養に特別な培地を必要とする、製造設備に新たな設備投資が必要となる、などの問題点が指摘されている。

さらに、特許文献4には、ドコサヘキサエン酸およびドコサペンタエン酸含有油脂を生産する能力を有するウルケニア属に属する微生物の培養物から該油脂を採取できることが記載されているが、上記と同様の問題点がある。

## 【0006】

一方、写真感光材料に必要な長鎖飽和脂肪酸 [C22:0 ベヘン酸] の生産原料にはナタネの種子油が多用されている。ナタネはC22成分を含まない品種が好まれるようになり、品種改良が進み、供給量が減少傾向にある。さらに、ナタネ種子油の硬化油には炭素数の近接した脂肪酸が含まれるために、高純度なベヘン酸を生産するためには精製の手間とコストが大きな問題となっている。従って、DHA並びにベヘン酸を安価に安定的に高純度に供給することができる有用脂質生産技術を開発することが求められている。

## 【0007】

【特許文献1】特開平1-199588号公報

【特許文献2】特開平10-72590号公報

【特許文献3】特許第2764572号公報

【特許文献4】特表2000-513575号公報

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

本発明の課題は、ドコサヘキサエン酸生産能の高い微生物を提供することにある。また、本発明の課題は、ドコサヘキサエン酸生産能を有する微生物を用いてドコサヘキサエン酸含有油脂を高収率でしかも複雑な工程を要せずきわめて効率よく製造する方法を提供することにある。更に、本発明の課題は、ドコサヘキサエン酸を効率よく製造する方法を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、ドコサヘキサエン酸(DHA)を高純度で生産する微生物(菌株)を見出した。この微生物は、培養が容易でDHA含量の多い油脂を生産することができ、またこの油脂から容易にDHAを高純度で採取することができる。この微生物が生産する油脂の不飽和脂肪酸C22成分を水素添加、及び加水分解することにより高純度のベヘン酸を取り出すことができる。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

## 【0010】

即ち、本発明によれば、ドコサヘキサエン酸生産能を有するスラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属菌株が提供される。

好ましくは、スラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属LFF1株(受託番号FERM P-19159)、該LFF1株と同一の種に属する菌株、または該LFF1株と実質的に同一の菌学的性質を有する菌株が提供される。

## 【0011】

本発明の別の側面によれば、ドコサヘキサエン酸生産能を有するスラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属菌株を培地中で培養し、培養物からドコサヘキサエン酸含有油脂を採取することを含む、ドコサヘキサエン酸含有油脂の製造方法が提供される。

好ましくは、ドコサヘキサエン酸生産能を有するスラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属菌株が、スラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属LFF1株(受託番号FERM P-19159)、該LFF1株と同一の種に属する菌株、または該LFF1株と実質的に同一の菌学的性質を有する菌株である。

## 【0012】

本発明のさらに別の側面によれば、油脂中に全脂肪酸あたり、ドコサペンタエン酸を10重量%以下、及びドコサヘキサエン酸を30重量%以上の量で含有する、ドコサヘキサエン酸含有油脂が提供される。好ましくは、ドコサペンタエン酸を10重量%以下、ドコサヘキサエン酸を30重量%以上、及びイコサペンタエン酸を4重量%以下の量で含有する、ドコサヘキサエン酸含有油脂が提供される。

好ましくは、本発明の油脂は、油脂中に全脂肪酸あたりドコサヘキサエン酸を50重量%以上の量で含有する。

## 【0013】

好ましくは、本発明の油脂は、ドコサヘキサエン酸生産能を有するスラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属菌株を培地中で培養し、培養物からドコサヘキサエン酸含有油脂を採取することによって得られる油脂である。

好ましくは、本発明の油脂は、スラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属LFF1株(受託番号FERM P-19159)、該LFF1株と同一の種に属する菌株、または該LFF1株と実質的に同一の菌学的性質を有する菌株を培地中で培養し、培養物からド

コサヘキサエン酸含有油脂を採取することによって得られる油脂である。

【0014】

好ましくは、本発明の油脂は、菌株の培養物から採取することによって得られる油脂を精製することによって得られる油脂である。

好ましくは、本発明の油脂は、菌体培養によって油脂を製造する途中の培養液若しくはその殺菌した培養液、又は培養終了時の培養液若しくはその殺菌した培養液、又はそれぞれから集菌した培養菌体若しくはその乾燥物、またはその培養液若しくはその菌体から該油脂を採取した後の残渣に含まれるものである。

【0015】

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の製造方法により得られるドコサヘキサエン酸含有油脂から、ドコサヘキサエン酸を単離することを含む、ドコサヘキサエン酸の製造方法が提供される。好ましくは、ドコサヘキサエン酸含有油脂をリパーゼで処理した後に、ドコサヘキサエン酸を単離する。

本発明のさらに別の側面によれば、上記したドコサヘキサエン酸含有油脂又はドコサヘキサエン酸に水素添加を行なうことを含む、ベヘン酸の製造方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記したベヘン酸を含むベヘン酸銀を用いる、写真感光材料の製造方法が提供される。

【発明の効果】

【0016】

本発明のドコサヘキサエン酸生産能を有するスラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属菌株を培養して油脂を生産することにより、ドコサヘキサエン酸(DHA)及びベヘン酸を安価に安定的に高純度で供給することができる。即ち、本発明のスラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属菌株を用いることにより、写真材料、飲食品、化粧品及び医薬品などの分野で有用なドコサヘキサエン酸含有量の高い油脂を高収率で効率よく製造することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(1) 本発明の菌株

本発明の菌株は、ドコサヘキサエン酸生産能を有するスラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属菌株であれば何れの菌株でもよい。好ましくは、菌株の培養物中に含まれる油脂中に、全脂肪酸あたり、ドコサペンタエン酸を10重量%以下、及びドコサヘキサエン酸を30重量%以上の量で含有することを特徴とする菌株である。

【0018】

本発明の菌株は、例えば、次のようなスクリーニング法に従って選択することができる。まず、採取した海水を0.4  $\mu$ mの滅菌フィルターを用いて濾過および集菌し、このフィルターを90%天然海水、グルコース、酵母エキス、ペプトンよりなる寒天培地上に張り付け、20~30℃で培養する。この寒天平板培地のフィルター上に形成したコロニーを、上記と同じ組成の寒天培地上で培養し、得られた菌体をスパーテルで採取し、常法に従って菌体から脂肪酸を直接メチルエステル化し、その組成をガスクロマトグラフィーで分析し、ドコサヘキサエン酸を産生している菌株を選択する。さらに、菌体内に油脂を乾燥菌体あたり10重量%以上、好ましくは20重量%以上の量で蓄積し、そして/または油脂中に全脂肪酸あたり、系ドコサペンタエン酸を10重量%以下、及びドコサヘキサエン酸を30重量%以上の量で含有する菌株を選択することができる。

【0019】

本発明の菌株の具体例としては、スラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属LFF1株(受託番号FERM P-19159)、該LFF1株と同一の種に属する菌株、または該LFF1株と実質的に同一の菌学的性質を有する菌株を挙げることができる。

【0020】

スラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属LFF1株は瀬戸内海から採取された菌株

である。L F F 1 株は適当な寒天培地（例えば、3%グルコース、0.5%酵母エキス、0.5%ペプトン、2%人工海水を含む2%寒天培地）において、直径10~20 $\mu$ mの球状の細胞から伸長した外質ネットを観察することができ、クロミスタ界（Kingdom Chromista）ラビリントウ綱（Class Labyrinthulea）ヤブレツボカビ科（Family Thraustochytriaceae）に属することが認められた。また、栄養細胞は運動性を示さず、細胞質分裂を伴わない核分裂を繰り返して多核状態となった後、遊走子を形成して、これを細胞外に放出した。このような生活史はトラウストキトリウム属（Genera Thraustochytrium）に特徴的である（Olive, L.S., The Mycetozoans. Academic Press, New York, USA, 1975; 本多大輔, ラビリントウ類の系統と分類. 海洋と生物 23:7-18, 2001）。

#### 【0021】

この分類は、L F F 1 株の細胞内脂質中にヤブレツボカビ科に特徴的なドコサヘキサエン酸やドコサペンタエン酸が顕著量含まれることや、18S rRNAの塩基配列に基づく分子系統解析によってL F F 1 株がトラウストキトリウム属のクラスターに埋没したことから明らかである。しかし、ヤブレツボカビ科の分類に関しては、形態や生活史に基づく分類体系と分子系統分類との整合性がとれておらず（Honda, D., et al., Molecular phylogeny of Labyrinthulids and Thraustochytrids based on the sequencing of 18S ribosomal RNA gene. Journal of Eukaryotic Microbiology 46:637-647, 1999）、L F F 1 株の種を同定するには至らなかった。

#### 【0022】

本発明のトラウストキトリウム(Thraustochytrium)属L F F 1 株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6）に平成14年12月17日付で寄託し、受託番号FERM P-19159を得ている。

#### 【0023】

また、本発明の菌株は、前記トラウストキトリウム(Thraustochytrium)属L F F 1 株（受託番号FERM P-19159）に限定されるものではなく、該L F F 1 株と同一の種に属する菌株、または該L F F 1 株と実質的に同一の菌学的性質を有する菌株をも包含する。

#### 【0024】

上記L F F 1 株と同一の種に属する菌株、並びに上記L F F 1 株と実質的に同一の菌学的性質を有する菌株は、本明細書中上記した通り、適当な寒天培地（例えば、3%グルコース、0.5%酵母エキス、0.5%ペプトン、2%人工海水を含む2%寒天培地）において性状を観察したり（直径10~20 $\mu$ mの球状の細胞から伸長した外質ネットを観察することができる、など）、栄養細胞の性状（運動性を示さず、細胞質分裂を伴わない核分裂を繰り返して多核状態となった後、遊走子を形成して、これを細胞外に放出する、など）を観察することにより同定することができる。

#### 【0025】

また、上述したL F F 1 株、該L F F 1 株と同一の種に属する菌株、または該L F F 1 株と実質的に同一の菌学的性質を有する菌株の変異株または組換え株も本発明の範囲内のものである。

#### 【0026】

例えば、ドコサヘキサエン酸をさらに高水準で産生するように設計された変異株および組換え株は、全て本発明の範囲内にある。このような変異株または組換え株には、同じ基質を用いて培養したときに、元の野性株が産生する量と比べて、油脂中のドコサヘキサエン酸の量が多くなるように、または総油脂量が多くなるように、あるいはその両方を意図して設計されたものが含まれる。さらに、費用効果の優れた基質を効率よく用いて、対応する野性型と同量のドコサヘキサエン酸を含有する油脂を産生するように設計された菌株も含まれる。

#### 【0027】

(2) ドコサヘキサエン酸含有油脂の製造



上記した本発明のドコサヘキサエン酸生産能を有するスラウストキトリウム (Thraustochytrium) 属菌株を培地中で培養し、培養物からドコサヘキサエン酸含有油脂を採取することによって、ドコサヘキサエン酸含有油脂を製造することができる。

#### 【0028】

スラウストキトリウム (Thraustochytrium) 属菌株 (例えば、FF1 株など) の増殖は、当該菌株を天然海水又は人工海水で調製した適当な培地に接種して、常法にしたがって培養することにより行うことができる。

#### 【0029】

培地としては、公知のものをいずれも使用できる。例えば、炭素源としてはグルコース、フルクトース、サッカロース、デンプンなどの炭水化物の他、オレイン酸、大豆油などの油脂類や、グリセロール、酢酸ナトリウムなどが例示できる。これらの炭素源は、例えば、培地 1 リットル当たり 20 ~ 120 g の濃度で使用することができる。窒素源としては、酵母エキス、コーンスチープリカー、ポリペプトン、グルタミン酸ナトリウム、尿素等の有機窒素、又は酢酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム等の無機窒素を使用することができる。無機塩としては、リン酸カリウム等を適宜組み合わせて使用できる。

#### 【0030】

また、ドコサヘキサエン酸の産生を促進するため、ドコサヘキサエン酸の前駆体を培地に添加することができる。前駆体としては、テトラデカン、ヘキサデカン、オクタデカンなどの炭化水素、テトラデカン酸、ヘキサデカン酸、オクタデカン酸、オレイン酸などの脂肪酸、またはその塩 (例えば、ナトリウム塩またはカリウム塩)、脂肪酸エステル、または脂肪酸を構成成分として含む油脂 (例えば、オリーブ油、大豆油、綿実油、ヤシ油) などを挙げることができるが、これらに限られるものではない。

#### 【0031】

上記の培地は、調製後、適当な酸又は塩基を加えることにより pH を 4.0 ~ 6.5 の範囲内に調整した後、オートクレーブにより殺菌して使用することが好ましい。

#### 【0032】

菌の培養温度は一般的には 10 ~ 45 °C であり、好ましくは 20 ~ 37 °C である。培養温度は、目的油脂組成を生産しうる培養温度に制御することが好ましい。培養の pH は一般的には、3.5 ~ 9.5 であり、好ましくは 4.5 ~ 8.5 で目的油脂組成を生産しうる pH に制御することが好ましい。培養期間は、例えば 3 ~ 7 日間とすることができ、通気攪拌培養、振とう培養又は静置培養で培養を行なうことができる。

#### 【0033】

このようにして、培養物中にドコサヘキサエン酸含有油脂を高濃度に蓄積した菌体が、培地 1 リットル当たり乾燥菌体重量で、一般的には 4 ~ 60 g 程度と、高い濃度で生産される。培養物から培養液と菌体とを分離する方法は、当業者に公知の常法により行なうことができ、例えば、遠心分離法や濾過などにより行なうことができ、特に遠心分離法が好適である。

#### 【0034】

上記の培養物から分離した菌体を、例えば、超音波やダイノミルなどによって破碎した後、例えば、クロロホルム、ヘキサン、ブタノール等による溶媒抽出を行うことにより、ドコサヘキサエン酸含有油脂を得ることができる。

乾燥菌体 100 g 当たりのドコサヘキサエン酸含有油脂の含有量は、10 ~ 80 g 程度であり、培地 1 リットル当たりのドコサヘキサエン酸含有油脂の生産量は、0.4 ~ 4.8 g 程度に達する。

#### 【0035】

また本発明の好ましい実施態様によれば、油脂の脂肪酸組成におけるドコサヘキサエン酸含有割合は、50 重量%以上と高濃度で含有される。したがって、培地 1 リットル当たりのドコサヘキサエン酸の生産量としては、0.2 ~ 3.8 g 程度と極めて高い。

#### 【0036】

本発明のドコサヘキサエン酸生産能を有するスラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属菌株は、好ましくは、乾燥菌体あたり油脂を10重量%以上蓄積することができ、さらに好ましくは20重量%以上蓄積することができる。このような本発明の菌株を用いて生産される油脂は、油脂中に全脂肪酸あたり、ドコサペンタエン酸を10重量%以下、及びドコサヘキサエン酸を30重量%以上の量で含有し、好ましくはイコサペンタエン酸を4重量%以下の量で含有する、ドコサヘキサエン酸含有油脂である。このドコサヘキサエン酸含有油脂は、好ましくは、油脂中に全脂肪酸あたりドコサヘキサエン酸を50重量%以上の量で含有する。

#### 【0037】

##### (3) ドコサヘキサエン酸の製造

ドコサヘキサエン酸含有油脂からドコサヘキサエン酸を分離するには、混合脂肪酸あるいは脂肪酸エステル状態で、常法により、例えば、尿素付加法、冷却分離法、高速液体クロマトグラフィー法あるいは超臨界クロマトグラフィー法などにより濃縮採取することにより行うことができる。

また、ドコサヘキサエン酸含有量の高い油脂は、ドコサヘキサエン酸含有油脂から鎖長の短い脂肪酸を遊離除去することにより製造することができる。この反応はエステラーゼ、リパーゼ等各種加水分解酵素を利用できるが、特にリパーゼで処理することによることが好ましく、更に好ましくは1, 3位選択的リパーゼで処理することが好ましい。

#### 【0038】

リパーゼは動物由来、植物由来、微生物由来の多くの種類が報告されている。植物由来リパーゼのヒマシリパーゼは位置選択性が低いことが知られている。また、微生物リパーゼでは*Candida cylindracea*, *Chromobacterium viscosum*, *Corynebacterium acnes*, *Geotrichum candidum*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Penicillium cyclopium*, 等は位置選択性が低いが、*Rhizopus delemar*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus niveus*, *Mucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium roqueforti*等は1, 3位置選択性を示すといわれている。さらに、1, 3位選択的リパーゼの例としては動物由来の膵臓リパーゼの活性がよく知られている。工業的に生産されかつ安価に安全に利用できる1, 3位選択的リパーゼとして、上記微生物由来の1, 3位置選択性リパーゼ及びブタ膵臓リパーゼ等を使用することができるが、特に好ましくは*Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*又は*Penicillium roqueforti*である。

#### 【0039】

リパーゼ処理反応は、pH4.0-9.0、20℃から60℃の範囲で行うことができる。

#### 【0040】

菌株としてスラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属菌株(例えば、LFF1株など)を用いた場合、得られるドコサヘキサエン酸含有油脂の脂肪酸組成の特徴として、油脂中に全脂肪酸あたり、ドコサペンタエン酸を10重量%以下、及びドコサヘキサエン酸を30重量%以上(さらに好ましくは50重量%以上)の量で含有することであり、好ましくはイコサペンタエン酸を4重量%以下の量で含有することである。このような油脂はドコサヘキサエン酸の濃縮分離の面で有利である。また、かかる油脂は、ドコサヘキサエン酸と生理活性が類似あるいは拮抗したそれらの脂肪酸をほとんど含まないことから、機能性食品や医薬品面での利用を目指す上でも好都合であり、特に写真感光材料で用いるベヘン酸の製造のために利用する上でも好都合である。

#### 【0041】

##### (4) 油脂およびドコサヘキサエン酸の利用

上記(2)および(3)に記載した油脂およびドコサヘキサエン酸は、種々の飲食品、飼料、または餌料に添加して使用することができる。このような食品の例としては、例えば、栄養補助食品、乳幼児用または未熟児用調製乳、健康食品、機能性食品、幼児用食品、妊産婦用食品、および老人用食品などが挙げられる。飼料としては、豚および牛などの家畜用飼料、鶏などの家禽用飼料、犬又は猫用のペットフード、および養魚用の飼料などが挙げられる。餌料としては、例えば、魚貝類の養殖のために餌料として与える微小生物

(いわゆる、動物プランクトン) のための餌料が挙げられる。特に、飼料および餌料用には、本発明の菌株の培養物、この培養物から集めた菌体、または油脂を採取した後の菌体の残渣を用いることが経済的に好ましい。

#### 【0042】

本発明の方法で製造した油脂およびドコサヘキサエン酸を飲食品に添加する場合、食品組成物は、固形もしくは液状の飲食品、または油脂を含む飲食品の形態でもよい。飲食中の油脂およびドコサヘキサエン酸の含量は、飲食品の性質に依存するが、好ましくは0.001重量%から50重量%程度である。

#### 【0043】

油脂を含む食品の例として、肉、魚、またはナッツ等の油脂を含む天然食品、スープ等の調理時に油脂を加える食品、ドーナッツ等の熱媒体として油脂を用いる食品、バター等の油脂食品、クッキー等の加工時に油脂を加える加工食品、あるいはハードビスケット等の加工仕上げ時に油脂を噴霧または塗布する食品等が挙げられる。本発明の油脂（あるいは分離されたドコサヘキサエン酸）はまた、油脂を含まない、農産食品、発酵食品、畜産食品、水産食品、または飲料に添加してもよい。

#### 【0044】

本発明の油脂およびドコサヘキサエン酸は、機能性食品に添加してもよい。機能性食品は、機能性食品は医薬製剤の形態であってもよく、または、タンパク質、糖類、脂質、微量元素、ビタミン類、乳化剤、または香料と本発明の油脂が配合された、経腸栄養剤、粉末、顆粒、トローチ、内服液、懸濁液、乳濁液、シロップ等の加工形態であってもよい。

#### 【0045】

さらに、本発明の油脂およびドコサヘキサエン酸は、化粧品または洗剤のための添加物として、あるいは医薬品として使用されるその誘導体を製造するための出発材料として使用することもできる。

#### 【0046】

化粧料の形態の例としては、特に限定されないが、例えば、乳液、クリーム、化粧水、パック、分散液、洗剤等の化粧品とすることができる。化粧料の基剤としては、化粧料の形態に応じた基剤、例えば、精製水、低級アルコール類、多価アルコール類、油脂類、界面活性剤、各種美容成分、紫外線吸収剤、増粘剤、色素、防腐剤、香料等を用いることができる。洗剤としては、薬用あるいは非薬用にかかわらず、身体を清浄に保つために一般に用いられる石鹸、シャンプー、フェイシャルクリーム、リンスなどが含まれ、さらに入浴剤や食器などの日常の家庭で用いる器具などの洗剤であってもよい。

#### 【0047】

なお、本発明の油脂およびドコサヘキサエン酸は、写真感光材料の成分であるベヘン酸銀の原料として特に有用であるが、これについては後述する。

#### 【0048】

(5) ベヘン酸の製造および該ベヘン酸を用いた写真感光材料の製造

本明細書中上記したドコサヘキサエン酸含有油脂、ドコサヘキサエン酸含有油脂、又はドコサヘキサエン酸に水素添加を行なうことによってベヘン酸を製造することができる。原料として油脂を用いる場合には、水素添加後に加水分解を行なうことによりベヘン酸を製造することができる。

#### 【0049】

本発明の方法で製造されるベヘン酸は、写真感光材料の一成分として用いられるベヘン酸銀を製造するために用いることができる。即ち、本発明の方法で製造されるベヘン酸を含むベヘン酸銀を用いて写真感光材料を製造する方法も本発明の範囲内のものである。

写真感光材料を製造の具体的手法は当業者に既知であり、例えば、特開2002-341484号公報、特開2002-328444号公報、特開2002-318431号公報、特開2002-311533号公報、特開2002-311531号公報などに記載されている。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されない。

## 【実施例】

## 【0050】

実施例 1: LFF1 株の単離と同定

LFF1 株は瀬戸内海から採取された菌株である。LFF1 株は適当な寒天培地 (3% グルコース、0.5% 酵母エキス、0.5% ペプトン、2% 人工海水を含む 2% 寒天培地) において、直径 10~20  $\mu\text{m}$  の球状の細胞から伸長した外質ネットを観察することができ、クロミスタ界 (Kingdom Chromista) ラビリンチュラ綱 (Class Labyrinthulea) ヤブレツボカビ科 (Family Thraustochytriaceae) に属することが認められた。また、栄養細胞は運動性を示さず、細胞質分裂を伴わない核分裂を繰り返して多核状態となった後、遊走子を形成して、これを細胞外に放出した。このような生活史はトラウストキトリウム属 (Genera Thraustochytrium) に特徴的である (Olive, L.S., The Mycetozoans. Academic Press, New York, USA, 1975; 本多大輔, ラビリンチュラ類の系統と分類. 海洋と生物 23:7-18, 2001)。

## 【0051】

実施例 2: LFF1 株を用いた油脂の製造

ジェーファーマンターを用いて以下の条件で LFF1 株を培養し、油脂を製造した。また、製造した油脂をガスクロマトグラフィにより組成分析した。

## (1) 培養条件

3 L ファーマンタ使用

培養量: 1. 8 L カルチャー

培地組成

10% グルコース

3. 3% 酵母エキス

50% 人工海水

0. 1% 消泡剤

0. 2% 酢酸アンモニウム

0. 2% リン酸二水素カリウム

## 【0052】

継代培養用は、アガロース培地へストリーク後、28℃で4日間静置培養し、出現したコロニーを冷蔵保存した。

アガロース培地

3% グルコース

1% 酵母エキス

50% 人工海水

0. 2% 酢酸アンモニウム

0. 2% リン酸二水素カリウム

1. 5% アガロース

## 【0053】

このコロニーをかきとり培地 80 ml で 28℃ 好気性下 16 時間振とう前培養し、ファーマンタへ植菌した。40 時間通気下 500 rpm で攪拌培養した。pH は制御しない。1500 G 30 分で集菌後、湿潤重量を測定した。-40℃で凍結した後、凍結乾燥を一晚行い乾燥重量を求めた。

## 【0054】

粉碎抽出条件

菌体の抽出は、クロロホルム:メタノール=2:1 を湿潤重量の 10 倍量、ガラスビーズを等倍量加え、高速掻き混ぜ機で水冷下攪拌した。濾過で粉碎菌体を分離し、等量の飽和食塩水で 2 回抽出洗浄を行なった後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。粗精製オイルは、エバポレーターで溶媒を除去し、重量を測定した。

## 【0055】

ガスクロサンプル調整

オイルをクロロホルムで溶解し、10% KOH (aq) : エタノール = 1 : 1 を加え、95℃で2時間加水分解した。2NのHClで中和後、エーテルで抽出しTMS ジアゾメタンを加え室温で2時間エステル化反応を行い、最後に酢酸を加えて反応を終了した。この反応液をガスクロマトグラフで解析した。ガスクロマトグラフのチャートを図1に示す。

**【0056】**

ガスクロマトグラフの条件

- ・カラム: DB-17 0.25 mm × 30 m
- ・キャリアーガス: He 入口圧 250 kPa
- ・カラム温度: 100℃ → 250℃ (昇温速度: 10℃/分)
- ・検出: FID

**【0057】**

培養の結果を以下に示す。

培養時間: 40時間

乾燥菌体重量: 24.0 g/Lカルチャー

全油脂量: 5.95 g/Lカルチャー

油脂含有率: 24.8% (全油脂量/乾燥菌体重量)

DHA量: 3.50 g/Lカルチャー

C22脂質: 3.69 g/Lカルチャー

**【0058】**

脂質組成

C15:0	1.8%
C16:0	18.8%
C17:0	9.7%
C20:5 (EPA)	2.2%
C22:5 (DPA)	3.2%
C22:6 (DHA)	58.8%

**【0059】**

実施例3: ベヘン酸への改質

実施例2で生産し抽出した全油脂分であるラビリンチュラオイル抽出物10gを安定化Ni触媒0.05gを触媒とし、エタノール100mL中でオートクレーブを用い150℃で2Mpaで5時間反応させた。反応後、室温まで冷却しクロロホルム100mLを加え生成物を溶解した後、この溶液からNi触媒をセライト濾過により除き、溶媒を減圧下流去した。

**【0060】**

この水素添加反応物に10%水酸化カリウム水溶液25mL及びエタノール50mLを加え、攪拌下30分間還流させた。室温まで冷却した後、生成した結晶を濾過し、エタノール20mLで洗浄した。

**【0061】**

得られた結晶を水-エタノール(1:1)50mLに加え、10%塩酸10mLを加え室温で1時間攪拌した。生成した結晶を濾過しエタノール20mLで洗浄した。この加水分解物を蒸留(0.5mmHg、185℃)することにより、純度95%のベヘン酸5gを得ることができた。

**【0062】**

実施例4

LFF1株より抽出した脂質0.2gに0.05M (pH 7.0) リン酸緩衝液4.0ml及び10%アラビアゴム溶液1.0mlを加え、ハイフレックスホモジナイザーで15000rpm、4分間処理して乳化させる。500μlずつ分注した後50U/100μlのRhizopus oryzae (アマノリパーゼF-AP15)を加え、37℃で振とうする。所定時間後エーテル1.0mlを添加して反応を停止し、脂質混合物をエーテルで抽出する。こ

れにTMSジアゾメタン(東京化成)を加え室温で2時間エステル化反応を行い、最後に酢酸を加えて反応を終了した。この反応液をガスクロマトグラフ(島津GC-2010、DB-17キャピラリーカラム)で解析した。ガスクロマトグラフ上で遊離した脂肪酸メチルエステルが検出された。表1に抽出脂質の脂肪酸組成を示す。油脂はC16成分とC22成分で組成の90%以上を占める。また、反応初期から2時間後まで遊離脂肪酸に占めるC16(パルミチン酸)とドコサヘキサエン酸の比を図2に示す。

【0063】

【表1】

表1: LFF1株から抽出した油脂の脂肪酸組成

脂肪酸	組成比 (%)
ペンタデカン酸 (C15:0)	2.79
パルミチン酸 (C16:0)	24.67
エイコサペンタエン酸 (C20:5)	2.64
ドコサペンタエン酸 (C22:5)	7.63
ドコサヘキサエン酸 (C22:6)	62.27
計100.00	

【0064】

反応初期ではC16の遊離が圧倒的に多く、その結果油脂中に残存するC22成分の比率が高くなる。例えば60分の反応で加水分解率32.5%に達するがその場合、脂質(グリセリド)として残存するC16成分は24%→10%へ低下し、DHA成分は62%→84%に増加する。

【0065】

実施例2で生産し抽出した全油脂分であるラビリンチュラオイル抽出物10gに0.05M(pH7.0)リン酸緩衝液100ml及び10%アラビアゴム溶液20mlを加え、ハイフレックスホモジナイザーで15000rpm、4分間処理して乳化させる。2000単位のRhizopus oryzae(アマノリパーゼF-AP15)を加え、37℃で60分間振とうする。エタノール400mlを加え、冷却後不溶物をろ過しエタノールを濃縮することにより、DHA含有量79%の脂質が5.7g得られた。

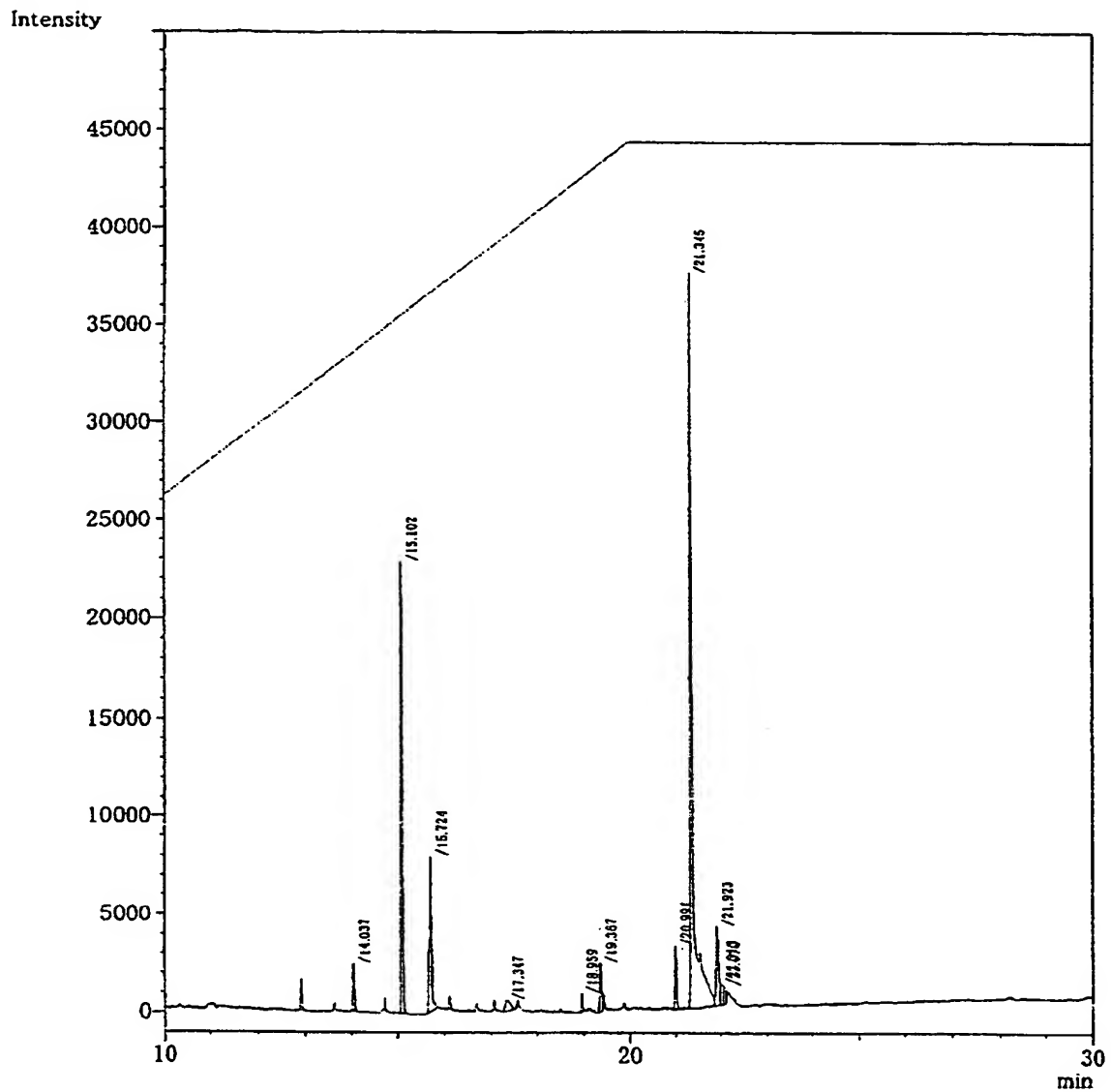
【図面の簡単な説明】

【0066】

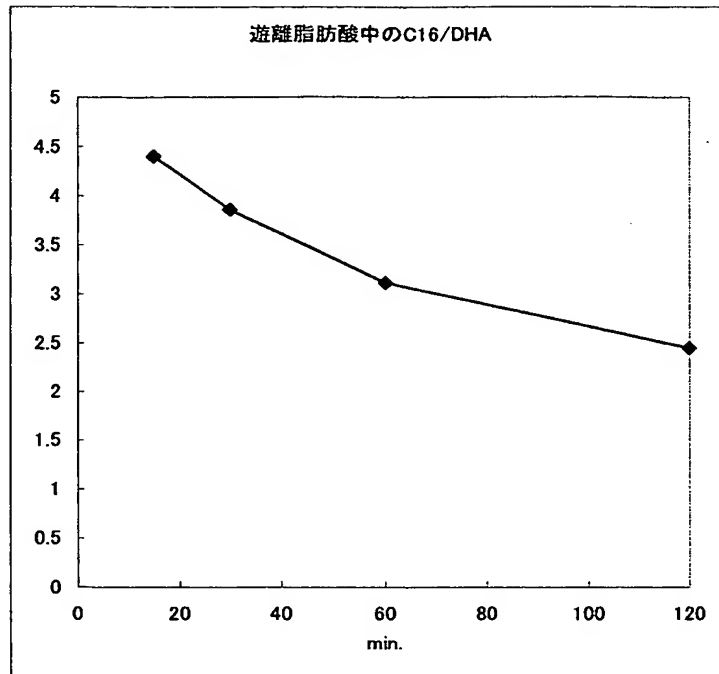
【図1】図1は、スラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)属LFF1株を用いて製造した油脂の脂質組成をガスクロマトグラフで分析した結果を示す。

【図2】図2は、アマノリパーゼF-AP15によるLFF1株産生油脂の加水分解の結果を遊離脂肪酸中のパルミチン酸とドコサヘキサエン酸の比として示す。

【書類名】 図面  
【図 1】



【図 2】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ドコサヘキサエン酸生産能の高い微生物を提供すること。

【解決手段】 ドコサヘキサエン酸生産能を有するスラウストキトリウム (Thraustochytrium) 属菌株。

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 3 1 7 1 1 0
受付番号	5 0 3 0 1 4 9 3 9 4 3
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 9 月 1 2 日

## &lt; 認定情報・付加情報 &gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】	000005201
【住所又は居所】	神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地
【氏名又は名称】	富士写真フイルム株式会社

## 【代理人】

申請人	
【識別番号】	110000109
【住所又は居所】	東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階
【氏名又は名称】	特許業務法人特許事務所サイクス

特願 2 0 0 3 - 3 1 7 1 1 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 5 2 0 1 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地

氏 名

富士写真フイルム株式会社